

**Zum Stoffwechsel der Sulfatide
in der Markscheide
alter Rattengehirne**

Hans Georg Meschede

1967

AUS DER BIOCHEMISCHEN ABTEILUNG (PROF. DR. H. JATZKEWITZ)
DES MAX-PLANCK-INSTITUTS FÜR PSYCHIATRIE
(DEUTSCHE FORSCHUNGSANSTALT F. PSYCHIATRIE)

MÜNCHEN

(Direktor: Professor Dr. G. Peters)

ZUM STOFFWECHSEL DER SULFATIDE
IN DER MARKSCHEIDE
ALTER RATTENGHIRNE

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und

einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

H a n s G e o r g M e s c h e d e

aus Pforzheim

München 1967

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. JATZKEWITZ
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Th. BÜCHER
Dekan: Prof. Dr. M. KIESE

Tag der mündlichen Prüfung: 11.7.67



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	5
Untersuchungsgang und Ergebnisse	9
Diskussion	20
Material und Methodik	26
1. Versuchstiere und radioaktives Material	26
2. Myelengewinnung	26
a. Gewinnung von Myelin und anderen subzellulären Gehirnfraktionen nach WHITTAKER et al.	26
b. Gewinnung von Myelin nach AUTILIO et al.	30
3. Lipoid- bzw. Sulfatidgewinnung aus Myelin	31
a. Dünnschichtchromatographie	32
b. Säulenchromatographie	33
4. Quantitative Sulfatidbestimmung	34
5. Radioaktivitätsmessung	34
Zusammenfassung	36
Literaturverzeichnis	37

EINLEITUNG

Die Markscheide, auch kurz "Myelin" genannt, umgibt mit einer Wandstärke bis 3μ die bis 15μ dicken Neuriten der Nervenzellen höherer Tiere. Lichtmikroskopisch (siehe Abb.1 A) erscheint sie im Querschnitt als ein Ring. Elektronenmikroskopisch (siehe Abb.1 B) lassen sich in ihr nahezu konzentrische (in Wirklichkeit spirallige) rhythmisch von innen nach außen wiederkehrende Schichten erkennen.

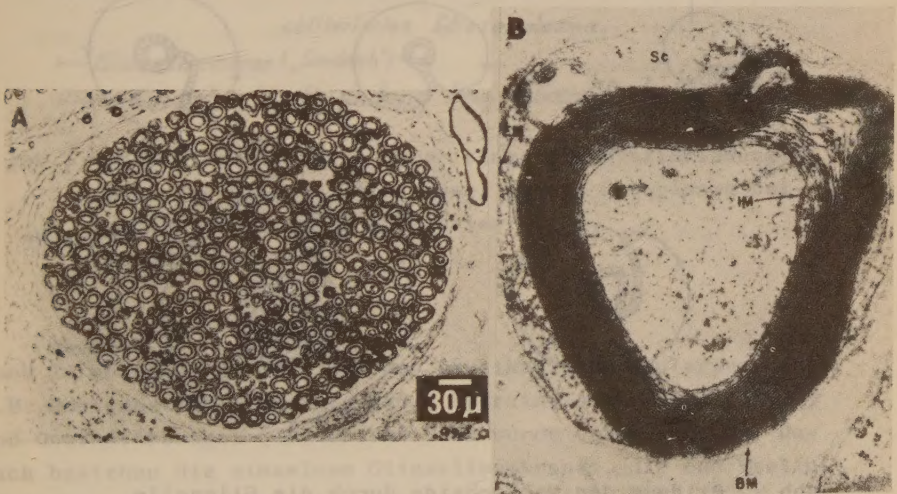


Abb.1 A. Lichtmikroskopisches Bild eines Bündels von Nervenfasern. Die hellen Ringe stellen die Markscheiden um die Neuriten dar.

B. Elektronenmikroskopisches Bild einer einzelnen Nervenfaser. Die Schichtung im Myelin ist deutlich zu erkennen.

Aus (30).

Die Markscheide wird erst bei der Entwicklung der Neuritenfunktion gebildet (z.B. bei der Ratte ab dem 10., am stärksten um den 25. Lebenstag; (39, 42)), und zwar durch die Neuroglia. Diese stellt das "Bindegewebe" des Nervensystems dar, dem im Vergleich zum Bindegewebe des übrigen Körpers besondere Fähigkeiten zukommen. Die Gliazellen umhüllen dabei den Neuriten seiner Länge nach und wickeln sich dann um ihn herum, wodurch der Gliazelleib zu einer langen Spirale ausgezogen wird (siehe Abb.2). Die dünne Cytoplasmaschicht in der Glia-spirale obliteriert und die beiden Zellmembranen "verkleben"

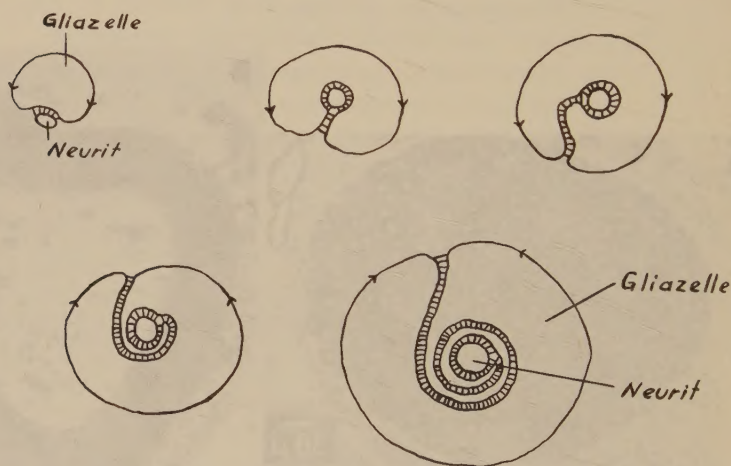


Abb.2 Bildung der Markscheide durch die Gliazelle.
Nach (18).

zu einer kompakten Doppellamelle. Die Summe der Windungen um den Neuriten ist die Markscheide. (5,18,32,35)

Das Myelin besteht demnach im wesentlichen aus Zellmembranen. Diese jedoch sind, wie auch andere Strukturelemente der Zelle, gemäß ihrer Aufgabe stabiler gebaut als solche Zellteile, die einem ständigen Umbau unterliegen. Das zeigt sich

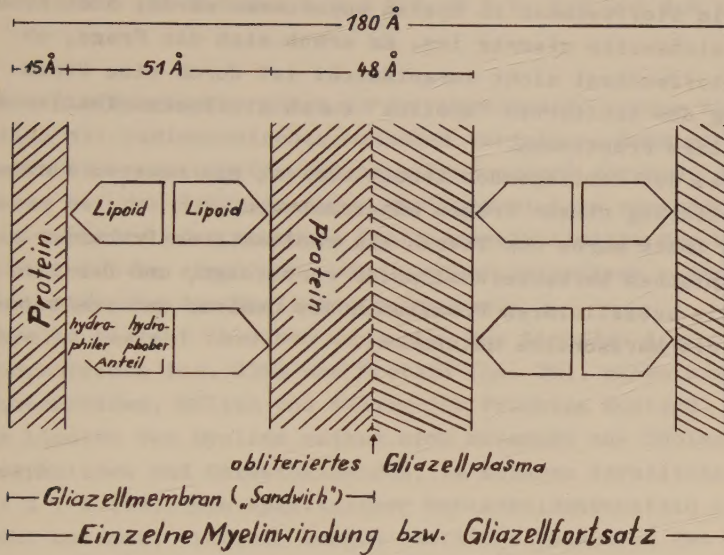


Abb.3 Molekulare Struktur einer einzelnen Myelinwindung bzw. des Gliazellfortsatzes, dessen Cytoplasma bei der Myelinisierung obliterierte.
Nach (15,16,38).

auch im molekularen Bau, der aus physikalischen Untersuchungen, z.B. Röntgenstrahlbeugungen (16), Hydratationsstudien (16,34) und Osmiumfärbungen (30) erschlossen wurde (siehe Abb.3). Danach bestehen die einzelnen Gliazellmembranen, die das Myelin aufbauen, aus zwei Proteinschichten, und diese wiederum tragen auf den einander zugewandten Seiten Lipoide ("Sandwich-Struktur"). Sind Diffusions- und Stoffwechselvorgänge schon innerhalb einer solchen Einzelmembran wesentlich erschwert, so dürfte das in noch viel stärkerem Maße für die Markscheide insgesamt gelten. Durch den Wickelprozeß liegen ja zahlreiche Membranen sehr dicht beieinander und erschweren stoffliche Veränderungen im Inneren des Myelins oder machen sie ganz unmöglich.

Daher überrascht es, daß auf Grund einiger radiochemischer

Versuche an myelinangereicherten subzellulären Gehirnfraktionen ein Stoffwechsel im Myelin angenommen wurde, auch wenn er vergleichsweise niedrig lag. Es erhob sich die Frage, ob dieser Stoffwechsel nicht vorgetäuscht ist durch eine Verunreinigung des isolierten "Myelins" durch stoffwechselaktivere subzelluläre Fraktionen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit neueren Methoden der Klärung dieser Fragen näherzukommen.

Zu dem Zweck wurde den Tieren ein radioaktiver Precursor eines typischen Markscheidenlipoids verabfolgt, und der Einbau in die subzellulären Fraktionen des Gehirns und insbesondere in die Markscheide untersucht.

U N T E R S U C H U N G S G A N G U N D E R G E B N I S S E

Die Stoffwechselvorgänge in der Markscheide lassen sich am besten mit radiochemischen Methoden verfolgen. Dazu wird den Tieren eine radioaktive Substanz (Precursor) gegeben, die von diesen bei der Synthese eines Myelinbausteines verwandt wird. Eine lebhaftere oder schwache Stoffwechselaktivität des Myelins drückt sich in einer mehr oder weniger intensiven radioaktiven Markierung der Myelinbausteine aus.

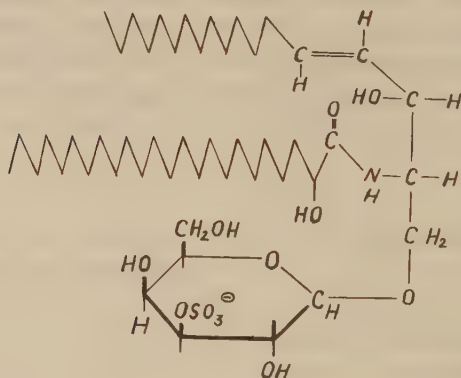
Myelin besteht chemisch vor allem aus Lipoiden (ca. 75%), Lipoproteiden (ca. 21%) und Protein (ca. 3%), neben wenig Polysacchariden, Salzen und Wasser (im feuchten Zustand) (3). Die Lipoide des Myelins setzen sich zusammen aus Cholesterin, Phosphatiden und Galaktolipoiden, im molaren Verhältnis von 2 : 2 : 1 (14). Ein spezifischer Markscheidenbaustein ist nicht bekannt, vielmehr kommen sämtliche Bausteine des Myelins auch im übrigen Gehirn vor, wenn auch in anderer Konzentration. Unter anderem charakteristisch sind jedoch die Sulfatide. Sie sind im Myelin stärker angereichert als in den anderen subzellulären Fraktionen (siehe Tab.1) und bei einer typi-

Subzelluläre Fraktion:	Konzentration der Gesamthirnsulfatide in der Fraktion (%):
Myelin	38,6
Kerne und Gewebetrümmer	9,5
Mitochondrien	34,2
Mikrosomen.....	14,9
Rest	8,4

Tab.1 Verteilung der Sulfatide im Gehirn der erwachsenen Ratte. Nach (9).

schen Markscheidenerkrankung, der Metachromatischen Leukodystrophie, selektiv vermehrt (22). Sie betragen 3,7% der

Myelinlipide bei der Ratte (etwa 4,5 Mikromol Sulfatide pro 100 mg Myelinlipide; 6) und gehören zu den Galaktolipiden, einer Untergruppe der Sphingolipide. Der lipophile Teil der Sphingolipide ist das Amid ("Ceramid" genannt) einer höheren Fettsäure (im Gehirn vorwiegend mit einer Kettenlänge von 24 C-Atomen) und des Fettaminoalkohols Sphingosin. Die Galaktose ist glykosidisch an die primäre Hydroxylgruppe des Sphingosins geknüpft. Die C_{24} -Fettsäure kann eine Hydroxylgruppe in Alphastellung zur Carboxylgruppe tragen; sie heißt dann Cerebronsäure, und die entsprechende Stammsubstanz Cerebron. Enthält die Fettsäure keine Hydroxylgruppe, dann heißt sie Lignocerinsäure, und die Stammsubstanz Kerasin. Bei den Sulfatiden ist die Galaktose des Cerebrons bzw. Kerasins am Kohlenstoffatom C_3 mit Schwefelsäure verestert. Der Cerebron-Schwefelsäureester zeigt folgende Strukturformel:



Für radiochemische Stoffwechseluntersuchungen eignen sich die Sulfatide besonders gut. Sie lassen sich von allen Myelinlipiden isoliert markieren, weil sie als einzige Lipide des Nervensystems Schwefel enthalten, und daher als einzige bei der Verwendung von ^{35}S -Sulfat als Precursor radioaktiv gekennzeichnet werden.

Als Versuchstiere dienten Ratten von Inzuchtstämmen, die

älter als ein halbes Jahr waren. Pro Ratte wählten wir als radioaktive Dosis 0,5 Millicurie ^{35}S -Sulfat.

Von den Applikationsarten des Precursors schien uns die intraperitoneale die geeignetste. Zwar hat die intracerebrale und auch die intralumbale Gabe den Vorteil, daß die "Blut-Hirn-Schranke" umgangen wird, d.h. die begrenzte Fähigkeit des Gehirns, Stoffe aus dem Blut aufzunehmen oder im Gehirn befindliche Stoffe an das Blut abzugeben (8). Jedoch muß mit einer Gewebsnekrose gerechnet werden (Trepanation des bei alten Ratten sehr harten Schädels, Drucksteigerung beim Injizieren der Sulfatlösung). Eine Lumbalpunktion andererseits ist bei Ratten sehr schwer durchzuführen.

Von den neueren Methoden zur Gewinnung subzellulärer Fraktionen aus Gehirn (z.B. 21,25,31,41) wurde die von WHITTAKER et al. (41) verwandt. Sie stellt eine Kombination von Differential- und Dichtegradientenzentrifugierung dar (Differentialz.: Die Zellpartikel werden durch Sedimentierung bei verschiedener Beschleunigung getrennt; Dichtegradientenz.: Die Zellpartikel werden durch Zentrifugation in Lösungen verschiedener Dichte hinein getrennt) und arbeitet nach folgenden Prinzipien:

Das Gehirn der Versuchstiere wird homogenisiert und seine Bestandteile werden grob in ein Sediment und einen Überstand aufgeteilt. Das Sediment wird durch Zentrifugation im diskontinuierlichen Dichtegradienten (0,32 m; 0,8 m; 1,2 m Saccharoselösung) in drei Fraktionen zerlegt, in "schweres" Myelin, Kerne und Gewebetrümmer. Aus dem anfangs gewonnenen Überstand erhält man neben den Mikrosomen durch gleichartige Dichtegradientenzentrifugation "leichtes" Myelin, Nervenendigungen und Mitochondrien (näheres siehe unter "Material und Methodik").

WHITTAKER verwandte die Methode zur Aufarbeitung von Meeresschweinchengehirnen. Sie ließ sich jedoch auch bei Rattengehirn anwenden. Die Menge eines einzelnen Rattengehirns (ca. 1,5 g) war allerdings für eine exakte subzelluläre Auftrennung zu gering; daher wurden jeweils die Gehirne von drei gleich behandelten Tieren zusammen verarbeitet.

Zunächst sollte ein Überblick erhalten werden, in welchen Fraktionen des Gehirns überhaupt der Precursor eingebaut wird. So wurden in einem ersten Versuch die Tiere zwei Tage nach der

^{35}S -Sulfatinjektion getötet und aus dem Gehirn alle subzellulären Fraktionen nach WHITTAKER gewonnen. Die feuchten Fraktionen wurden, in konz. Ameisensäure gelöst, auf die Aluminiumträgerplättchen für den Methandurchflußzähler gegeben. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels wurde die Radioaktivität gemessen. Dabei ergab sich eine etwa gleich niedrige Aktivität in allen Fraktionen. Diese Einförmigkeit konnte durch gleichmäßige Verunreinigung aller Fraktionen mit nicht eingebautem ^{35}S -Sulfat aus Interzellularflüssigkeit und Blut verursacht sein.

In den nächsten Versuchen wurde daher der Lipoidanteil einiger Fraktionen isoliert. Zu dem Zwecke wurden die Fraktionen in einem Chloroform/Methanol-Gemisch (vol. 2:1) aufgenommen und der lösliche Teil mit 1/5 des Volumens an dest. Wasser versetzt ("FOLCH-Verteilung"; 26). Nach dem Entmischen wurde die die Lipide enthaltende Unterphase getrocknet (= "Gesamtlipoid-extrakt") und ihre spezifische Radioaktivität (= Impulse bzw. Zerfälle pro Minute/mg Lipide) im "Packard"-Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. Sie lag bei Gesamthirnhomogenat, Myelin und Kernen wiederum in der gleichen Größenordnung.

Die Wiederholung des Versuchs brachte das gleiche Ergebnis auch für die anderen Fraktionen (siehe Tab.2). Berechnete man

Gesamthirnhomogenat	Leichtes Myelin	Schweres Myelin	Kerne und Gewebetr.	Nervenendigg.	Mitochond	Mikrosomen
31	50	37	50	11	47	41

Tab.2 Spezifische Radioaktivität ($\frac{\text{Impulse/min}}{\text{mg Lipide}}$) der Lipide aus subzellulären Fraktionen alter Rattengehirne. Den Tieren waren 36 Tage zuvor 0,5 Millicurie ^{35}S -Sulfat intraperitoneal verabreicht worden. Gewinnung der Fraktionen nach WHITTAKER et al. (41).

jedoch statt der spezifischen die gesamte Lipoidaktivität der Fraktionen, so fand man im leichten Myelin 17%, im schweren

sogar 58% der gesamten Hirnaktivität. Letztere entsprach jedoch - wie zu erwarten - nur einem Bruchteil der injizierten Aktivität, nämlich 1/100 000.

Es wurde nun versucht, die Proteolipide (Verbindungen aus Protein und Lipiden, die in Fettlösungsmitteln löslich sind), die die Bestimmung durch ihren eventuell radioaktiv markierten Proteinanteil stören konnten, mit Hilfe von Formalin zu entfernen. Tatsächlich konnte durch dieses Verfahren eine Dissoziation der Proteolipide in Protein und Lipoid unter Denaturierung des Proteins erzielt werden. Trotzdem lag die spezifische Aktivität der proteolipidfreien Lipide bei allen Fraktionen etwa in gleicher Höhe (siehe Tab.3).

Gesamthirnhomogenat	Leichtes Myelin	Schweres Myelin	Kerne und Gewebetr.	Nervenendigg.	Mito- chon.	Mikro- somen
22	20	18	54	24	19	6

Tab.3 Spezifische Radioaktivität ($\frac{\text{Impulse/min}}{\text{mg Lipide}}$) der proteolipidfreien Lipide aus subzellulären Gehirnfractionen alter Ratten. Den Tieren waren 12 Tage zuvor 0,5 Milli-curie ^{35}S -Sulfat intraperitoneal verabreicht worden. Gewinnung der Fraktionen nach WHITTAKER et al. (41).

Um den Sulfatidgehalt der Lipide in den verschiedenen Fraktionen abzuschätzen, wurden die Lipide dünnschichtchromatographisch an Kieselsäure aufgetrennt. Die einzelnen Komponenten wurden durch Besprühen mit dem Reagens nach KÄGI-MIESCHER (37) (Anisaldehyd/Schwefelsäure/Eisessig) sichtbar gemacht. Die Fleckenintensität der Komponenten gab einen groben Anhalt für ihre Substanzmenge.

Würde Myelin mehr Sulfatide als die anderen Fraktionen enthalten, so hätten die vielen Myelinsulfatide dafür um so weniger markiert sein müssen, da die spezifische Lipoid-Aktivität des Myelins nicht höher war als die der anderen Fraktionen. Gleichbedeutend damit wäre besonders niedriger Stoffwechsel

der Sulfatide im Myelin gewesen. Doch die Sulfatidfleckenintensität der einzelnen Fraktionen wich nur wenig voneinander ab.

Auf diesem dünnenschichtchromatographischen Weg konnten aber die Sulfatide aus dem Gesamtlipoidextrakt der Markscheide isoliert werden und ihre spezifische Aktivität direkt bestimmt. Dazu wurden die Lipoidkomponenten mit einem indifferenten Reagens, Bromthymolblau, sichtbar gemacht. Die Sulfatide wurden aus den Kieselsäureflecken eluiert und getrocknet. Ihre spezifische Aktivität betrug beim leichten Myelin 1 320, beim schweren 3 570 $\frac{\text{Impulse/min}}{\text{mg Sulfatid}}$.

Dieser Einbau sollte noch einmal für das Myelin gesichert werden, und zwar an einer besonders reinen Präparation, die die Verfälschung der Ergebnisse durch Verunreinigung mit anderen subzellulären Fraktionen möglichst ausschließt. Es wurde daher die bisher verwandte Methode nach WHITTAKER et al. zur Isolierung von Myelin durch die von AUTILIO et al. (3) ersetzt. Die WHITTAKER-Methode war seit einigen Jahren (40) im wesentlichen unverändert geblieben. AUTILIO hatte sie unter Berücksichtigung von Flotationsversuchen (31) speziell zur Reindarstellung von Myelin weiter entwickelt. Er verwandte zwar weiße Substanz aus Ochsenhirn, doch ließ sich das Verfahren auch auf das Rattengesamthirn als Ausgangsgewebe übertragen.

Nach AUTILIO wird das homogenisierte Gewebe über eine Saccharoselösung (0,656 m) pipettiert und zentrifugiert. Das Myelin reichert sich an der Oberfläche der Zuckerlösung an, während die meisten anderen Fraktionen zum Boden des Zentrifugenbeckens absinken. Das Verfahren wird mit der myelinangereicherten Schicht wiederholt und diese dadurch weiter gereinigt. Nach Abtrennen des mikrosomalen Anteils wird das reine Myelin gewonnen durch Zentrifugation in einen kontinuierlichen Dichtegradienten aus Saccharoselösung (0,32 bis 0,8 m). Es sammelt sich dabei etwa in der mittleren Zone des Gradienten an (näheres siehe unter "Material und Methodik").

Parallelversuche wurden nun durchgeführt mit beiden Myelindarstellungsarten. Die Ergebnisse zeigt Tab.4 .

Die höhere spezifische Aktivität der proteolipidfreien Lipide im AUTILIO-Myelin könnte durch deren höheren Sulfatid-

Myelin	Spezifische Aktivität	
	der proteolipidfreien Lipoide	der Sulfatide (dünn-schichtchromat. gewonnen)
nach AUTILIO	170	500
nach WHITTAKER	80	4 000

Tab.4 Spezifische Aktivität ($\frac{\text{Zerfälle/min}}{\text{mg Substanz}}$) der proteo-
lipidfreien Lipoide bzw. der Sulfatide von Myelin,
das einmal nach AUTILIO et al. (3) und einmal nach
WHITTAKER et al. (41) aus erwachsenen Rattengehir-
nen gewonnen wurde. Den Tieren waren 7 Tage zuvor
0,5 Millicurie ^{35}S -Sulfat intraperitoneal verab-
reicht worden.

gehalt bedingt sein, der seinerseits als eine Folge der größe-
ren Reinheit dieses Myelins erscheinen könnte. Die niedrigere
spezifische Aktivität der Sulfatide im AUTILIO-Myelin kann man
ebenfalls als Merkmal seiner geringeren Kontaminierung ansehen
unter der Annahme, daß die Verunreinigungen des Myelins einen
höheren Stoffwechsel aufweisen als dieses selbst. Schließlich
spricht für die größere Reinheit der AUTILIO-Fraktion, daß sie
fast ganz in Chloroform/Methanol löslich ist; AUTILIO (3) hatte
nämlich gefunden, daß mit der Abnahme der Myelinverunreini-
gungen dessen in Chloroform/Methanol unlöslicher Rest immer
geringer wird.

Um die bisherigen Ergebnisse zu sichern, wurden die Versuche
am Myelin mit der Darstellungsmethode nach AUTILIO wiederholt.
Dabei sollten gleichzeitig orientierende Vorversuche über die
Zeitabhängigkeit der Myelinmarkierung unternommen werden. So
wurden erwachsene Ratten 4 Stunden ("M 4"), 12 Stunden ("M 12")
und 48 Stunden ("M 48") nach der Injektion des Precursors ge-
tötet und ihre Gehirne aufgearbeitet. Aus den Myelinlipiden

wurden die Sulfatide durch präparative Dünnschichtchromatographie dargestellt und ihre spezifische Aktivität ermittelt. Eine quantitative Kontrolle der so gewonnenen "Sulfatide" nach JATZKEWITZ (23) zeigte jedoch, daß sie nur zu 15-25% rein waren, in der Hauptsache aber aus gelöstem Chromatographieradsorbens, Kieselsäure, bestanden. Die spezifische Aktivität betrug also das Fünffache des zunächst angenommenen Wertes (siehe Tab.5).

Spezifische Aktivität	"M 4"	"M 12"	"M 48"
der dünnschichtchromat. gewonnenen "Sulfatide"	120	80	170
der Reinsulfatide (nach Korrektur)	890	340	1 030

Tab.5 Spezifische Aktivität ($\frac{\text{Zerfälle/min}}{\text{mg Substanz}}$) dünnschichtchromatographisch gewonnener Myelinsulfatide vor und nach Korrektur durch quantitative Sulfatidbestimmung nach JATZKEWITZ (23). Das Myelin wurde nach AUTILIO et al. (3) aus den Gehirnen alter Ratten gewonnen, die 4, 12 und 48 Stunden ("M4", "M 12", "M 48") nach der intraperitonealen Applikation von 0,5 Millicurie ^{35}S -Sulfat getötet wurden.

Da die Sulfatide aus dem Myelingesamtlipoidextrakt durch präparative Dünnschichtchromatographie sich nur unbefriedigend gewinnen ließen, wurde versucht, sie säulenchromatographisch zu isolieren nach der Methode von MEHL und JATZKEWITZ (27), unter Verwendung von Florisil (Magnesiumsilikat) als Adsorbens. Hierbei werden die Lipide des Gesamtlipoidextrakts mit aktiviertem Florisil von den Phosphatiden befreit und die im Eluat befindlichen Sulfatide durch Chromatographie an entaktiviertem Florisil mit Chloroform/Methanol/Wasser - Mischung rein gewonnen.

Das Verfahren ist für eine Lipoidausgangsmenge von 5 g beschrieben. Es wurde für eine Lipoidmenge von 10-13 mg modifiziert. Zur Überprüfung wurden die Myelinlipide von Rattengehirnen aufgearbeitet und die Brauchbarkeit der Mikrovariante durch die Dünnschichtchromatographie der Eluate bewiesen.

Stellt man die Gewichte der einzelnen, auf diese Weise im Gehirnaufarbeitungsgang erhaltenen Teilkomponenten zusammen, so ergibt sich das Bild der Tab.6.

Gehirn	1,8	g
Myelin (gewonnen nach AUTILIO, gefriergetrocknet).	5,9	mg
Myelin-Gesamtlipoidextrakt	3,1	mg
Phosphatidfreie Lipide	1,8	mg
Sulfatide	0,15	mg

Tab.6 Gewichte der Teilkomponenten, die bei der Aufarbeitung eines alten Rattengehirns zu Myelinsulfatiden nach der säulenchromatographischen Methode (27) erhalten werden. (Mittel von 11 Rattengehirnen)

Man erhält also nach diesem Aufarbeitungsmodus aus dem Myelingesamtlipoidextrakt alter Rattengehirne etwa 5% Sulfatide, was den Angaben in der Literatur (3,7%; 6) weitgehend entspricht.

Um die Radioaktivität der Myelinsulfatide auch über einen größeren Zeitraum zu verfolgen, wurden von den Tieren, die die ³⁵S-Sulfatinjektion erhalten hatten, 5 Ratten nach einem Tag ("S 1"), 3 Ratten nach 11 Tagen ("S 11") und 3 Ratten nach 85 Tagen ("S 85") getötet und die Markscheide aus ihren Gehirnen nach AUTILIO et al. gewonnen. Der Gesamtlipoidextrakt wurde in üblicher Weise daraus dargestellt; die Sulfatide wurden säulenchromatographisch isoliert. Die Ergebnisse zeigt Tab.7.

Wenn man die Werte der Tab.7 als repräsentativ ansieht und als Kurvenpunkte benutzt, deren Abszissenabschnitt die Zeit und deren Ordinatenabschnitt die spezifische Aktivität der

	"S 1"	"S 11"	"S 85"
$\frac{\text{Zerfälle/min}}{\text{mg Sulfatide}}$	1 490	2 880	640
$\left(\frac{\text{Mikrocurie}}{\text{Millimol Sulfatide}} \right)$	(0,55)	(1,08)	(0,24)

Tab.7 Spezifische Aktivität säulenchromatographisch nach MEHL und JATZKEWITZ (27) gewonnener Myelinsulfatide. Das Myelin wurde nach AUTILIO et al. (3) aus den Gehirnen alter Ratten dargestellt, die 1, 11 und 85 Tage ("S 1", "S 11", "S 85") nach der intraperitonealen Applikation von 0,5 Millicurie ^{35}S -Sulfat getötet wurden.

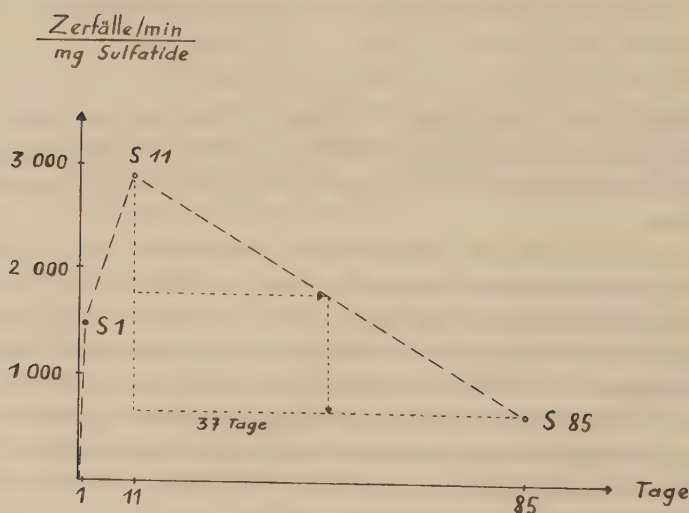


Abb.4 Graphische Auswertung der Tab.7

Myelinsulfatide darstellt (siehe Abb.4), so kann man folgendes aussagen: In der aus alten Rattengehirnen nach AUTILIO et al. gewonnenen Markscheidenfraktion wird ^{35}S -Sulfat in die Sulfatide eingebaut. Das Maximum des Einbaus liegt später als 24 Stunden ("S 1"). Die Punkte "S 11" und "S 85" weisen auf einen Abbau der Sulfatide hin; die Markierung beträgt nach 37 Tagen nur noch die Hälfte, wie sich aus einer einfachen Rechnung bzw. aus der Zeichnung ergibt.

D I S K U S S I O N

Wie aus den Ergebnissen hervorgeht, wird in alle subzellulären Fraktionen des Gehirns alter Ratten (Kerne, Gewebetrümmern, Nervenendigungen, Mitochondrien, Mikrosomen, Myelin) radioaktives Sulfat eingebaut. Dieser Einbau ist jedoch nur gering, was im Einklang steht mit Befunden, die schon früher am Gesamthirn erhoben wurden (8,9,19,20,33).

Das kann begründet sein durch die "Blut-Hirn-Schranke" (vgl. "Untersuchungen und Ergebnisse", S.11) und durch strukturelle Elemente, die relativ stoffwechsellinert und im Gehirn besonders zahlreich vorhanden sind. Unter diesen ragt, schon mengenmäßig, das Myelin hervor.

Stoffwechselstabilität wurde für die Markscheide auch aus anderen Gründen gefordert:

Da sie für nähere Untersuchungen zunächst nicht in reiner Form zur Verfügung stand, war man anfangs vom Gesamtgehirn ausgegangen. KOCH (24) hatte gefunden, daß die maximale Zunahme der Sulfatide im Gehirn zusammenfällt mit der maximalen Myelinisierung. Daher lokalisierte man die Sulfatide vor allem im Myelin. Radiochemische Untersuchungen (19,20,33) ergaben nun, daß die Gehirnsulfatide sehr stoffwechselträge sind. Also schloß man, daß auch Myelin stoffwechselträge oder -inaktiv sein mußte.

Damit stimmte überein, daß bei den Isotopenversuchen, wo statt des Gesamthirns nur die myelinreiche weiße Substanz verwandt wurde, die hierin festgestellte Radioaktivität deutlich unter dem Niveau des Gesamthirns lag.

Auch Schlüsse aus physikalischen Untersuchungen (vgl. "Einführung", S.7) gingen dahin, daß durch die Myelinlipide eine dicht gepackte und hochstabile Membranstruktur erreicht wird (30), so daß sich die Frage erhob, ob die gefundene geringe Stoffwechselaktivität nicht durch andere, mit Myelin vergesellschaftete Strukturkomponenten hervorgerufen wird. Erst neuerdings läßt sich diese Frage beantworten, da Nervengewebe noch weiter aufgetrennt und neben anderen subzellulären Fraktionen auch das Myelin angereichert bzw. isoliert werden kann.

Überraschenderweise wurden nun im Myelin Lipide mit verschiedener Stoffwechselaktivität gefunden: So bauten alte Ratten ³⁵S-Sulfat sehr rasch in die Myelinsulfatide ein; dabei enthielt das Myelin 60% der Gesamthirnsulfatid-Aktivität (10). Auch die Polyphosphoinositide im Myelin erwiesen sich als hochdynamisch. Dagegen zeigte sich der Großteil der Phosphatide im Myelin alter Tiere stoffwechsellinert (12,13).

Die Unterschiede lassen sich erklären durch reelle oder artifizielle Gegebenheiten. Reelle Differenzen solchen Ausmaßes verwundern; man erwartet eher bei allen Myelinlipiden etwa gleich großen Stoffwechsel. Die Annahme von Artefakten liegt näher, da die Versuchsbedingungen von einem zum anderen Untersucher erheblich schwankten.

So hatten die Tiere nicht dasselbe Alter, obwohl bereits der Unterschied von einer Lebenswoche völlig verschiedene Ergebnisse bringen kann (9). Die Ernährung übt Einflüsse aus (4). Weder die radioaktive Dosis noch die chemische Verbindungsform und auch nicht der Applikationsmodus des Precursors waren einheitlich gewählt, obwohl von wesentlicher Bedeutung (4,7,11). Nicht zuletzt stellte fast jeder Untersucher die Myelinfraktion nach seiner eigenen Methode dar; die ungleiche Beimengung von Nicht-Myelin-Anteilen könnte daher als wesentlicher Störfaktor in Erscheinung treten.

In unseren eigenen Versuchen waren wir bestrebt, solche Störfaktoren schrittweise immer mehr zu eliminieren, um der Erfassung des tatsächlichen Stoffwechsels im Myelin so nah wie möglich zu kommen.

So verwandten wir möglichst alte Ratten (wenigstens ein halbes Jahr alt), die mit einem Standardfutter ernährt wurden. Sie erhielten ³⁵S als Sulfat intraperitoneal injiziert. Die intraperitoneale Applikation wurde der wesentlich effektiveren intracerebralen vorgezogen, um Gehirnläsionen zu vermeiden. ³⁵S-Sulfat wurde gewählt, um damit die einzigen schwefelhaltigen Markscheiden-typischen Lipide, die Sulfatide, zu markieren und damit überschaubare Verhältnisse zu schaffen. Die Dosis betrug das 10-50 fache von der, die die meisten anderen Autoren applizierten; das Verhalten der Tiere deutete nicht daraufhin, daß durch die starke Strahlenbelastung allgemeine Schädigungen gesetzt wurden, die den normalen Ablauf der biochemischen Prozesse stören könnten. Durch die Verabfolgung der hohen Dosis

sollte einerseits verhindert werden, daß im Falle eines nur geringen Myelinstoffwechsels zu wenig Bausteine markiert würden und ein Einbau sich dem Nachweis entzöge. Andererseits läßt sich ein Abbau der Myelinbausteine radiochemisch um so besser feststellen, je größer der Anteil der radioaktiv markierten Moleküle an der Baustein-Gesamtmenge ist, denn der Abbau erfolgt nach statistischen Gesetzen; die Methode aber erfaßt nur die markierten Anteile.

Die subzellulären Fraktionen gewannen wir nach WHITTAKER et al. (41), später das Myelin nach AUTILIO et al. (3). EVANS und FINEAN (14) haben die beiden Methoden bei Ochsenhirn überprüft. Sie kommen zu dem Ergebnis, daß bei der WHITTAKER-Myelindarstellung die Verunreinigung durch Mitochondrien, Mikrosomen und Kerne gering ist, und bei der nach AUTILIO zu vernachlässigen.

Um die radiochemischen Verunreinigungen durch wasserlösliches ^{35}S -Sulfat auszuschließen, extrahierten wir aus der Myelinfraktion die Lipide. Dann trennten wir den Proteinanteil der dabei miterhaltenen Proteolipide durch Formalin ab, damit er nicht, etwa durch radioaktiv markiertes Methionin, zu Fehlschlüssen verleite. Um auch innerhalb der Lipoidgruppe Störungen zu vermeiden und um die spezifische Aktivität nicht nur der Gesamtlipide, sondern die beweiskräftigere der markierten Lipoiduntereinheit zu erhalten, isolierten wir die Sulfatide, erst dünn-schicht-, dann säulenchromatographisch.

So ist nach unseren Versuchen, vor allem den letzten ("S 1", "S 11" und "S 85"), der geringe Einbau von ^{35}S -Sulfat in die Myelinsulfatide des erwachsenen Rattengehirns signifikant, und nicht vorgetäuscht. Aus den wenigen Versuchsdaten kann der zeitliche Verlauf dieses Stoffwechsels nur abgeschätzt werden. Er deutet auf ein Maximum des Einbaus nach mehr als 24 Stunden hin, mit einer spezifischen Aktivität von 1,08 Mikrocurie/Mikro-ml Sulfatide, sowie auf einen Abbau dieser Lipide, da die Sulfatmarkierung nach 37 Tagen nur noch die Hälfte betrug.

Dabei ist allerdings zu bedenken, daß das Fehlen eines Stoffwechsels sich schwerer beweisen läßt als das Vorhandensein, denn bei der Empfindlichkeit der radiochemischen Methode läßt sich die Deutung eines Einbaus als Verunreinigung nie ganz widerlegen, da die üblichen Reinheitskriterien wie Elektronenmikroskopie oder analytisch-chemische Bestimmungen (3) hier versagen.

Daß diese Verunreinigung in unseren Versuchen radiochemisch verursacht war, ist bei dem Aufarbeitungsgang, der zur Isolierung der Sulfatide führt, weniger anzunehmen. Eher ist an eine Beimengung von ^{35}S -sulfatidhaltigen Nicht-Myelin-Komponenten in der Fraktion zu denken. Damit in Übereinstimmung fanden EICHBURG und DAWSON (13) einen starken Rückgang des "Turnovers" von von Phosphatiden in rohem Myelin beim Übergang zu der hochgereinigten Fraktion.

Nach Abschluß des experimentellen Teils dieser Arbeit erschien eine Veröffentlichung von DAVISON und GREGSON (11), die unsere Ergebnisse bestätigt.

Die Autoren injizierten alten Ratten ^{35}S -Sulfat intracerebral und fanden ebenfalls eine Markierung der Myelinsulfatide. Das Maximum der Myelinmarkierung stellten sie 4 Stunden nach der Applikation fest, und zwar mit 50-60% der Gesamthirnsulfatid-Aktivität. Die maximale spezifische Aktivität im Myelin betrug mit 126 Mikrocurie/Millimol Sulfatide etwa das 100 fache der von uns gefundenen, was sich durch die Unterschiede in der Applikationsart zwanglos erklärt. Einem zunächst raschen Abfall der Myelinsulfatidaktivität folgte ein langsamerer. Die Autoren schlossen daraus auf zwei Stoffwechsel-Compartments: ein kleines, aber rasch austauschendes, das zu einem großen, aber langsam austauschenden hin geöffnet ist. Der schnell austauschende Teil macht 0,2% der Myelinsulfatide aus.

Eine kritische Betrachtung ihrer Ergebnisse unterlassen die Untersucher. Ihre Methode der Myelindarstellung weicht jedoch von der AUTILIOs erheblich ab, auch in Bezug auf die Ergebnisse der chemischen Myelinzusammensetzung (6,7). Das könnte bedeuten, daß das Myelin von DAVISON und GREGSON mehr Nicht-Myelin-Anteile enthielt als das von AUTILIO. Damit wäre auch eine mögliche Erklärung gegeben für die hohe Einbauquote dieses Myelins, welche die in alle anderen Fraktionen übertrifft. Dieses Ergebnis steht ja im Gegensatz zu den bereits erwähnten Befunden, wo gerade ein um so geringerer ^{32}P -Einbau in die Phosphatide gefunden wurde, je reicher die Fraktion an Myelin war (2,13). Die Benutzung eines einzelnen Rattengehirns und der Dünnschichtchromatographie könnten weitere Fehlerquellen sein.

Versucht man, den Einbau des ^{35}S -Sulfats in die Markscheide eines erwachsenen Tieres zu deuten, so bieten sich mehrere Möglichkeiten:

Für eine "lebenslängliche Myelinisierung" (d.h. die Gliazelle "rotiert" um den Neuriten zwar zur Zeit der Markreifung besonders schnell und die Geschwindigkeit dieses Prozesses nimmt wieder ab, aber zum völligen Stillstand kommt er nie) könnte die nur langsam abfallende Radioaktivität des einmal markierten Myelins sprechen nach dem raschen Einbau des Precursors (11).

Andererseits nimmt die Größe der Markscheide während der Er-wachsenenzeit nicht mehr zu, obwohl neues Material noch eingelagert wird, wie hier am Beispiel der Sulfatide gezeigt wurde. Danach wäre auch ein "Turnover" möglich (d.h. Austausch von alten Bausteinen gegen neue). Diesem würde auch der von uns gefundene Abfall der radioaktiven Markierung innerhalb von 37 Tagen auf die Hälfte besser entsprechen.

DAVISONs (10,11) zwei Stoffwechsel-Compartments würden beiden Deutungen gerecht: Rasches Turnover des einen Compartments findet an der Oberfläche der Markscheide statt. Zudem wird aber das markierte Stück durch Weiterrollen der Spirale physikalisch den Austauschvorgängen entzogen. Diesen Teil stellt das lang-same Compartment dar.

Daneben können Diffusionsprozesse innerhalb der Markscheiden-lamellen nach Meinung mancher Autoren doch nicht ganz ausge-schlossen werden (38). Da die Markscheide auch im erwachsenen Tier noch ein Fortsatz der Glia bleibt und mit dem Zugrunde-gehen der Gliazelle ebenfalls untergeht, könnten diese Aus-tauschvorgänge innerhalb der Markscheide auch den Gliastoff-wechsel widerspiegeln.

Die Frage nach der Lokalisierung dieser Stoffwechselvor-gänge in der Markscheide läßt sich ebenfalls noch nicht end-gültig beantworten. Es ist naheliegend, zunächst an die äußer-ste Markscheidenlamelle (38) oder an den innersten Teil, der dem Neuriten anliegt (7), zu denken. Jedoch scheint zumindest das dynamische Compartment weder das komplette Äußere noch das Innere der Markscheide darzustellen, da diese Oberflächen 5-10% des Myelins ausmachen, der rasch austauschende Pool aber nur 0,2% (11).

Betrachtet man die Markscheide nicht im Querschnitt, sondern der Länge nach, so könnten auch die paranodalen Regionen - als morphologisch und biochemisch heterogene Stellen - für die Aus-tauschvorgänge diskutiert werden (11). Hier sind die Myelinla-

mellen nämlich nicht spiralisiert, und es lassen sich Organellen und Oligodendroglia plasma nachweisen (28).

Mit unseren Untersuchungen können die hier angeschnittenen Fragen nicht beantwortet werden. Dazu bedarf es wahrscheinlich ergänzender autoradiographischer Verfahren.

M A T E R I A L U N D M E T H O D I K

1. Versuchstiere und Radioaktives Material

Als Versuchstiere dienen mit Standardfutter ernährte, weibliche Sprague-Dawley-Ratten von 330 g (280-480 g) Gewicht. 5-6 Monate alte Ratten wiegen etwa 260 g (9); die Versuchstiere sind also älter als ein halbes Jahr.

Die Tiere erhalten jeweils eine radioaktive Dosis von 0,5 Millicurie, die ihnen in Form von 0,5 ml einer isotonischen, trägerfreien Lösung von ^{35}S -Sulfat intraperitoneal gespritzt werden.

In verschiedenen Zeitabständen nach der Injektion werden die Tiere mit Chloroform betäubt und dekapitiert.

2. Myelin-Gewinnung

Da die exakte Aufarbeitung eines einzelnen, nur etwa 1,5-2 g schweren Rattengehirns schwierig ist, werden jeweils in einem Versuch die Gehirne von drei Tieren zusammen verarbeitet.

Die den getöteten Tieren rasch entnommenen Gehirne werden mit dem 9 fachen Volumen eisgekühlter 0,32 m Saccharoselösung (= 0,32 m Sacchl.) in einem Homogenisator mit Teflonpistill nach POTTER-ELVEHJEM (1) homogenisiert (Spaltbreite zwischen Pistill und Gefäßwand: ca. 0,30 mm). Die folgenden Schritte werden alle bei etwa 4 Grad Celsius ausgeführt.

a. Gewinnung von Myelin und anderen subzellulären Gehirnfraktionen nach WHITTAKER et al. (41)

Hierzu siehe Abb.5.

Das Homogenat wird durch Zentrifugieren bei 1 000 x g (11 min) in ein Sediment S_1 und einen Überstand U_1 aufgeteilt. S_1 wird gewaschen durch Suspendieren in frischer 0,32 m Sacchl. und unter denselben Bedingungen wie das Homogenat nochmals zentrifugiert. Dann wird S_1 in soviel 0,32 m Sacchl. verteilt, daß pro 1 g Ausgangsgewebe 0,5 ml Suspension erhalten werden.

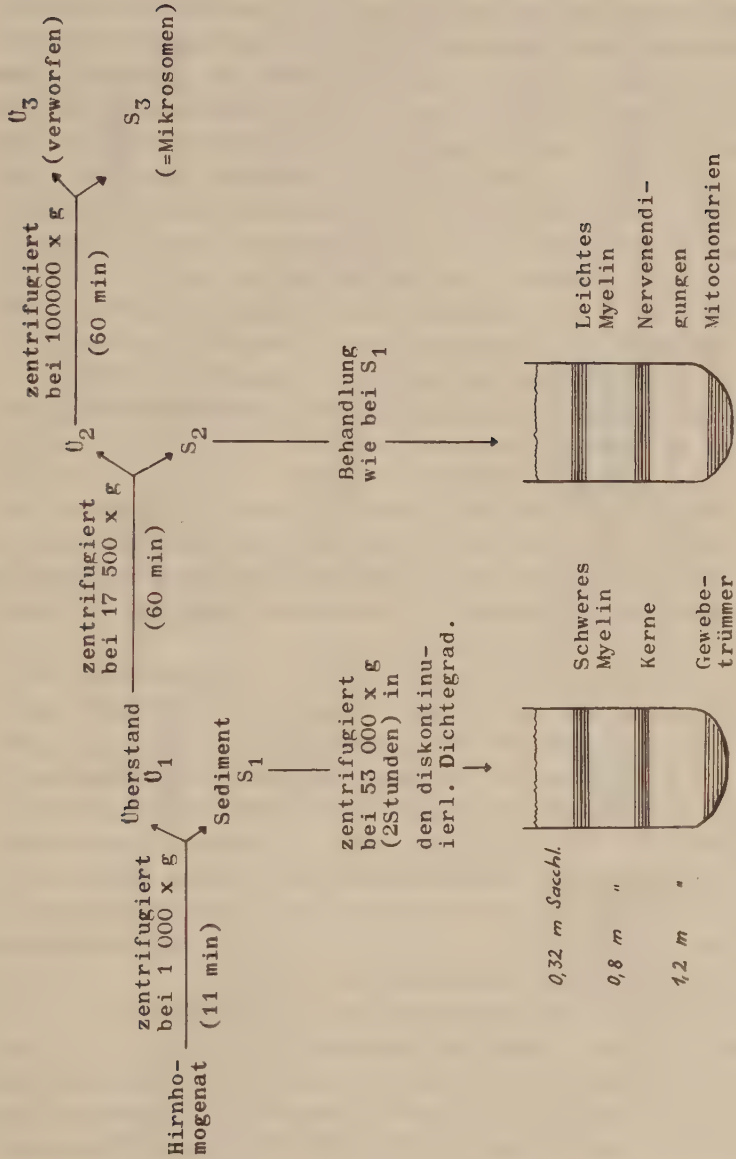


Abb.5 Auftrennung von Rattenhirnhomogenat in Myelin und andere subzelluläre Fraktionen nach WHITTAKER et al. (41).

In den durchsichtigen Plastikbechern für den Zentrifugenausschwingrotor der Firma "Christ" wird ein diskontinuierlicher Dichtegradient hergestellt durch Pipettieren einer Schicht von 0,8 m Sacchl. (10 ml pro Becher) über das gleiche Volumen einer 1,2 m Sacchl. Das in wenig 0,32 m Sacchl. fein verteilte Sediment S_1 wird vorsichtig darüber geschichtet (1-2 ml), und durch Zentrifugation bei 53 000 x g (2 Stunden) in drei Fraktionen getrennt, die sich in verschiedenen Zonen der Trägerflüssigkeit befinden. Die oberste Bande (zwischen 0,32 und 0,8 m Sacchl.) besteht "fast ausschließlich aus s c h w e r e n M y e l i n - Fragmenten mit einigen kleineren vesikulären Elementen", die mittlere Bande (zwischen 0,8 und 1,2 m Sacchl.) aus "Kernen mit einigen Mitochondrien, Myelinfragmenten, wenig Nervenendigungen und Gewebetrümmern", die Fraktion am Boden des Bechers "hauptsächlich aus G e w e b e t r ü m m e r n mit Blutzellen" (41).

Die Fraktionen werden mit Pipetten getrennt abgehoben, mit dest. Wasser gewaschen und bei 100 000 x g resedimentiert.

Der Überstand U_1 wird bei 17 500 x g (60 min) zentrifugiert und dadurch in ein Sediment S_2 und einen Überstand U_2 aufgeteilt.

S_2 wird genau wie S_1 in 0,32 m Sacchl. aufgeschlämmt und auf die gleiche Art und Weise in ebenfalls drei Fraktionen aufgetrennt. Die oberste Bande enthält nun "l e i c h t e M y e l i n - Fragmente, kontaminiert durch Mikrosomen und einige Nervenendigungen", die mittlere Bande ein "nahezu reines N e r v e n e n d i g u n g e n - Präparat mit schwacher Mikrosomen-Verunreinigung, aber weitgehend frei von Myelinteilen und frei von Mitochondrien", die Fraktion am Boden des Bechers "M i t o c h o n d r i e n mit gelegentlich geschrumpften Nervenendigungen" (41).

Aus U_2 wird durch Zentrifugation bei 100 000 x g (60 min) ein "gelatinöses Präcipitat hauptsächlich aus M i k r o s o m e n , d.h. vesikulären Membranfragmenten von 0,1-0,2 μ Durchmesser, und kleineren Partikeln, kleinen Mitochondrien, kleinen Nervenendigungen und nichtvesikulären Membranfragmenten" gewonnen (41).

Auch diese Fraktionen werden mit dest. Wasser gewaschen und wieder sedimentiert.

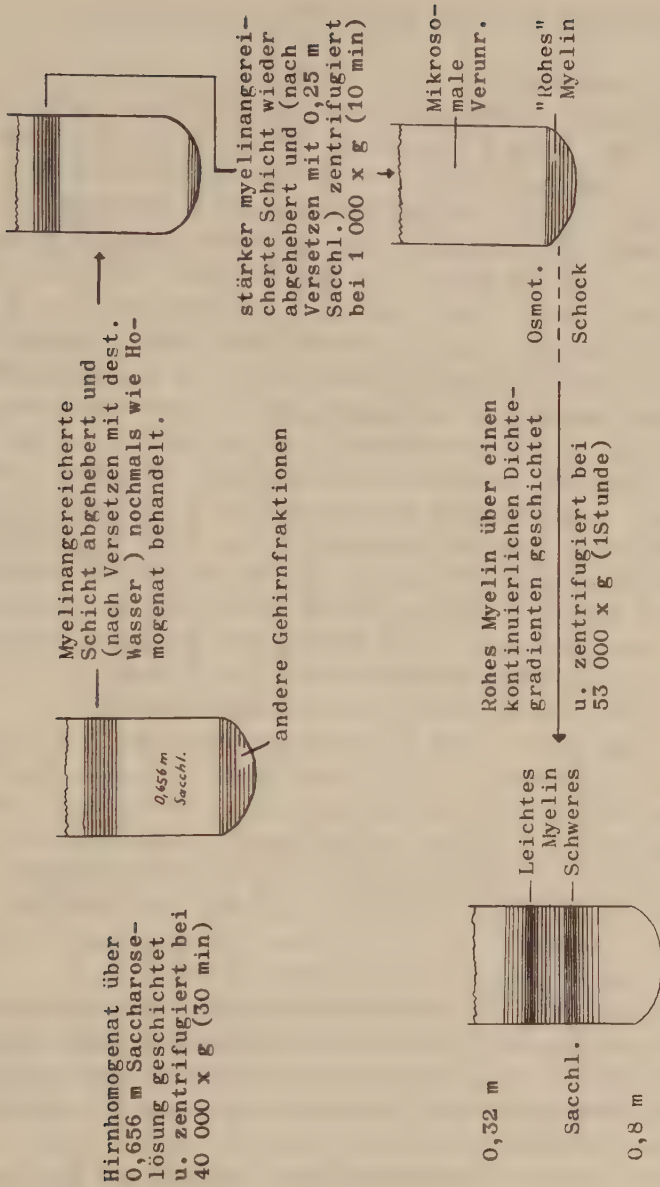


Abb.6 Gewinnung von Myelin aus Rattenhirnhomogenat
nach AUTILIO et al. (3).

b. Gewinnung von Myelin nach AUTILIO et al. (3)

Hierzu siehe Abb.6

Das 10%ige Hirnhomogenat wird in Portionen von 25 ml über 20 ml einer 0,656 m Sacchl. in die durchsichtigen Plastikbecher für den Ausschwingrotor (dieser Rotor erwies sich als günstiger als der von AUTILIO vorgesehene Rotor mit fester Achse) der "L₂-Ultrazentrifuge" der Firma Beckman-Spinco pipettiert, und bei 40 000 x g zentrifugiert (30 min). Das Myelin konzentriert sich über der 0,656 m Sacchl., wird abpipettiert und, mit dem gleichen Volumen Wasser versetzt, nochmals wie das Hirnhomogenat behandelt. Die Myelinschicht wird abermals abgehebert. Zur Entfernung der Mikrosomenkontamination wird sie nun entweder mit 0,25 m Sacchl. auf das 18 fache Volumen des Ausgangsgewebes gebracht (3), oder - in der Variante nach EICHBERG und DAWSON (13) - mit dem 2,2 fachen Volumen dest. Wassers versetzt und bei 1 000 x g (10 min) zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wird das am Boden des Bechers erhaltene "rohe" Myelin zur Entfernung etwaiger Neuritenanteile einem Osmotischen Schock unterworfen durch Suspendieren in dest. Wasser und - nach GENT et al. (17) - 20 Minuten langes Stehenlassen im Eisbad.

Das rohe Myelin wird nach dem Aufschlännen in möglichst wenig 0,32 m Sacchl. (1-2 ml) vorsichtig auf einen kontinuierlichen Dichtegradienten (zwischen 0,8 und 0,32 m Sacchl., Volumen etwa 40 ml; siehe unten) gegeben. Nach Zentrifugation bei 53 000 x g (1Stunde) werden die dicht beieinander, etwa in der Zone der 0,5 m Sacchl. liegenden Schichten des "leichten" und "schweren" Myelins zusammen abpipettiert, zweimal mit dest. Wasser gewaschen und wieder sedimentiert.

Der kontinuierliche Dichtegradient wird mit Hilfe einer Glasapparatur bereitet, die nach den Angaben von SALO und KOUNS (36) angefertigt ist (siehe Abb.7). Dabei werden die 0,32 m Sacchl.-Kammer und die 0,8 m Sacchl.-Kammer mit den entsprechenden Lösungen etwa gleich hoch (ca. 20 ml) gefüllt. Erst werden wenige ml der reinen 0,32 m Sacchl. auf den Boden des Zentrifugenbeckers abgelassen, dann wird allmählich der 0,32 m Sacchl.-Kammer immer mehr 0,8 m Sacchl. zugeführt und durch

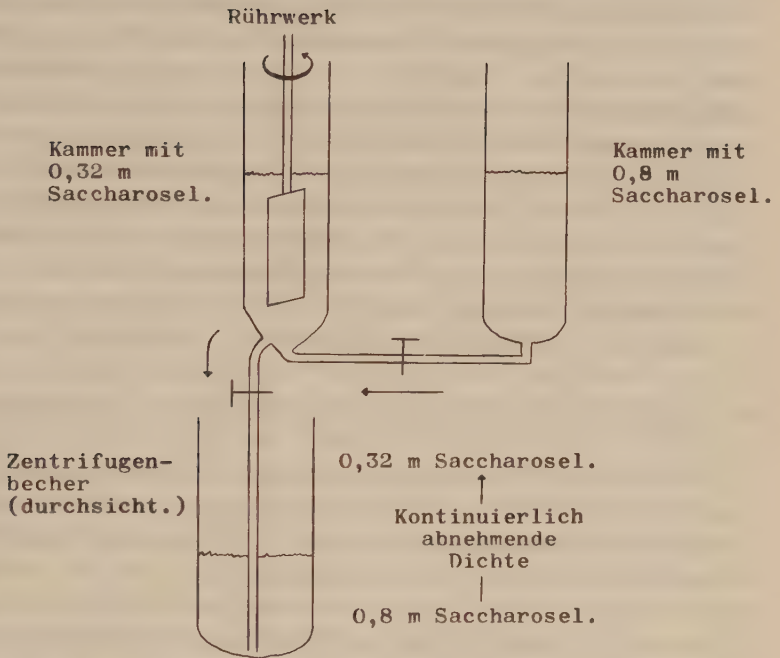


Abb.7 Apparatur zur Herstellung des kontinuierlichen Dichtegradienten nach SALO und KOUNS (36).

ein Rührwerk vermischt. Die nun schwerere Mischung wird ebenfalls in den Zentrifugenbecher abgelassen; dabei drückt sie die dort schon vorhandene leichtere Lösung hoch. Den Schluß bildet die reine 0,8 m Sacchl. als unterste Schicht im Becher.

3. Lipoid- bzw. Sulfatidgewinnung aus Myelin

Die Lipide bzw. Sulfatide werden aus allen subzellulären Fraktionen genau wie aus Myelin gewonnen; im folgenden wird

daher nur die Isolierung aus Myelin beschrieben.

Das feuchte Myelin wird zur Zerstörung von Proteolipiden formalinfixiert - durch Zusatz von ebensoviel 40%igem Formalin und anschließendes Auswaschen - oder gefriergetrocknet. Dann versucht man, möglichst viel davon durch Versetzen mit Chloroform/Methanol-Gemisch im Volumenverhältnis 2:1 (= Chlf./Meth.) und Schütteln im Wasserbad (5 Minuten bei 55 Grad Celsius; 41) in Lösung zu bringen. Durch die Zweiphasenverteilung nach FOLCH et al. (26) wird eine erste Auftrennung erzielt. Die Lösung wird dazu mit 1/5 ihres Volumens an dest. Wasser versetzt, geschüttelt und durch Stehenlassen entmischt. Die sich bildende Oberphase wird verworfen und die Unterphase, die die Gesamtlipide enthält, getrocknet.

a. Dünnschichtchromatographie in Anlehnung an JATZKEWITZ (23)

Bei der dünnschichtchromatographischen Methode wird auf Glasplatten (20x20 cm) eine 0,4 mm starke Schicht "Kieselgel-G-nach Stahl" (Firma Merck AG., Darmstadt) als wässrige Suspension aufgestrichen, die zunächst luftgetrocknet und dann 30 Minuten bei 110 Grad Celsius "aktiviert" wird. Unter Freilassung eines 2 cm breiten Randstreifens wird auf der Startlinie (2 cm vom Unterrand entfernt) der Gesamtlipidextrakt (4-5 mg Substanz, in 1 ml Chlf./Meth. gelöst) zusammen mit zwei Test-Sulfatiden aufgetragen. Die Platte wird bei Kammersättigung zunächst in eine Lösung von Chloroform/Methanol/Wasser 73:28:4,5 (1.Fließmittel) gestellt und, nachdem das Fließmittel über die Startlinie gelaufen ist und den oberen Plattenrand erreicht hat (Dauer: etwa eine Stunde bei 20 Grad Celsius), weitere 10 Minuten in der Lösung belassen. Da schlecht zu sehen ist, wann das Fließmittel den oberen Rand erreicht hat, wird etwa 2 cm unterhalb des oberen Plattenrandes ein Tupfen Sudanrot gesetzt, der als Wegweiser dient. Die Schicht wird durch anschließendes 30 Minuten langes Erwärmen auf 50 Grad Celsius im Trockenschrank vom Lösungsmittel befreit.

Nach dem Erkalten wird die Platte mit dem 2. Fließmittel behandelt. Dazu wird in einer zweiten Trennkammer über Nacht (14 Stunden bei 20 Grad Celsius) eine Lösung von n-Propanol /Konz. Ammoniak/Wasser 80:8:12 stehen gelassen. Nun läßt man

diese in derselben Richtung wie das 1. Fließmittel 9 cm über die Startlinie auf der Dünnschichtplatte emporsteigen. (Dauer: ca. eine Stunde bei 20 Grad Celsius). Die Schicht wird durch mindestens zweistündiges Erwärmen auf 70-80 Grad Celsius vom Lösungsmittel befreit.

Kalt geworden, wird sie mit einer 0,01%igen ammoniakalischen Bromthymolblau-Lösung sehr fein und gleichmäßig übersprüht, so daß die Lipoidflecken gelb auf gleichmäßig durchfeuchtetem blauem Untergrund sichtbar werden. Sie werden sofort, noch feucht, durch punktiertes Umranden mit einer Nadel markiert und dann etwa eine dreiviertel Stunde bei 60 Grad Celsius im Trockenschrank getrocknet. Die lipoidimprägnierte Kieselgelschicht wird abgekratzt, in Papierhüllen überführt und mit Chlf./Meth. eluiert, bei den ersten Versuchen im SOXHLET-Gerät heiß, später kalt. Zur Reinigung des Eluats von Bromthymolblau und Kieselsäure wird das Eluat "FOLCH-verteilt" (Schütteln mit 1/5 des Volumens an Wasser, hier unter Hinzufügen eines Tropfens konz. Ammoniak zur besseren Eliminierung des Farbstoffs; 26), und die Sulfatid-haltige Unterphase getrocknet.

b. Säulenchromatographie nach MEHL und JATZKEWITZ (27)

Das Makroverfahren nach MEHL und JATZKEWITZ muß auf Lipoid-Mikromengen als Ausgangsstoff übertragen werden. Dafür wird eine geeignete Apparatur aus Glas angefertigt. Sie besteht aus einem Rohr von 100 mm Höhe und 6 mm Innendurchmesser, mit einer G₂-Glasfilter-Bodenplatte (Firma Schott und Gen., Mainz) und einem aufsetzbaren 50 ml-Scheidetrichter mit Calciuchloridrohr.

Zur Phosphatid-Abtrennung wird Florisil der "mesh"-Zahl 60-100 nach mehrfachem Aufschlännen in Methanol im Trockenschrank auf 60 Grad Celsius über Nacht erhitzt (= "aktiviert"). Auf 1 g des im Rohr mit Chlf./Meth. zu einer Säule gepackten Florisils wird der Gesamtlipoidextrakt gegeben (10-13 mg Substanz). Das mit 14 ml Chlf./Meth. erhaltene Eluat ist phosphatidfrei.

Zur Sulfatid-Isolierung wird aktiviertes Florisil von 200 mesh durch Versetzen mit 10% Wasser und 15 stündiges Schütteln "entaktiviert". 0,5 g davon werden im Rohr mit Lösungsmittel

(=Lm) I (siehe unten) befeuchtet, und die ebenfalls in wenig Lm I gelösten phosphatidfreien Myelinlipide auf die Säule gegeben (5,5-7,5 mg). Eluiert wird mit 20,6 ml von Lm I, 12,4 ml von Lm II und 12 ml von Lm III. Die Sulfatide finden sich im Eluat der zweiten Hälfte von Lm II und in Lm III. (Lm I = Chloroform:Methanol: Wasser wie 92:8:0,5 - Lm II = 88:12:1,4 - Lm III = 86:14:1,7).

Die Brauchbarkeit des Mikroverfahrens wird zuvor an unmarkiertem Rattenmyelin getestet. Das Eluat der Myelinlipide nach der Phosphatidabtrennung und das Eluat nach der weiteren Aufspaltung am entaktivierten Florisil werden dünnschichtchromatographisch überprüft (23); als Sprühreagens wird hier Anisaldehyd/Schwefelsäure/Eisessig nach KÄGI-MIESCHER (37) benützt. Das Mikroverfahren erweist sich dabei als geeignet und liefert die Sulfatide in sehr großer Reinheit.

4. Quantitative Sulfatidbestimmung nach JATZKEWITZ (23)

Ähnlich wie bei der dünnschichtchromatographischen Sulfatid-Isolierung werden auf einer Kieselsäuregelplatte Testsulfatide in verschiedener bekannter Konzentration (für die Eichkurve) und die zu untersuchenden Sulfatide aufgetragen. Behandlung mit Fließmitteln wie bei 3a., S.32.

Die Menge der Sulfatide wird in den ausgekratzten, lipoidhaltigen Kieselsäureanteilen mit Hilfe von Anthron-Reagens direkt kolorimetrisch ermittelt.

5. Radioaktivitätsmessung

Die Radioaktivität der Proben kann mit dem Methandurchflußzähler (Geigerzählertyp) der Firma Friesseke und Höpfner oder im Flüssigkeitsszintillationszähler der Firma Packard (Tricarb Liquid Scintillation Spectrometer, Modell 314 EX) gemessen werden.

Beim Methandurchflußzähler wird die gelöste Substanz auf Aluminium-Trägerplättchen aufgebracht, getrocknet, und die Impulse werden in definiertem Abstand vom Zählfenster 10 Minuten gemessen.

Beim Szintillationszähler werden durch die Strahlung des ra-

radioaktiven ^{35}S -Schwefels die Moleküle einer besonderen "Zählflüssigkeit" (siehe unten) zur Aussendung von Lichtblitzen angeregt und letztere gezählt. Dazu werden in den Zählgläschen 10 ml der "Phosphorzähllösung" (5 g PPO = 2,5 - Diphenyloxazol und 0,3 g Dimethyl-POPOP = 1,4-bis-2(4-Methyl-5-phenyloxazolyl)-benzol in 1 l Toluol) mit 6 ml Äthylenglykol-monomethyläther gemischt.

Zur Eliminierung des normalen Backgrounds werden zunächst die Leerwert-Impulse der nur mit Zählösung gefüllten Gläschen bestimmt, dann wird die in 0,2 ml Chlf./Meth. gelöste Substanz zugegeben. Die Impulse werden mehrere Stunden lang gezählt, um vor allem bei Proben mit kleiner Impulsrate den statistischen Fehler möglichst niedrig zu halten, der durch den ungleichmäßigen radioaktiven Zerfall gegeben ist.

Um den sogenannten "Quenching-Effekt" (Dämpfung der Szintillation durch gewisse Substanzen, z.B. zu große Mengen Chlf./Meth.) zu vermeiden, werden die gefüllten Zählgläschen mit verschiedenen Mengen Chlf./Meth. versetzt. Bis zu 0,2 ml verringern die Zählausbeute nicht. Eine Dämpfung durch die gelösten Sulfatide wurde bei den geringen Stoffmengen nicht beobachtet.

Um den Zerfall von ^{35}S (Halbwertszeit 87 Tage) in der Probe zu berücksichtigen, muß ein "Standard" mitbestimmt werden. Als solcher dient ein bekannter Teil des Ausgangssulfats. Durch Vergleich mit ihm kann aus den im Zähler gefundenen "Impulsen" auf die absoluten "Zerfälle" geschlossen werden, die die Probe ohne zeitliche Radioaktivitätsabnahme bei 100%iger Zählausbeute des Meßgeräts zeigen würde.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Mit Hilfe der Isotopenmarkierungstechnik und neuerer Methoden zur Darstellung subzellulärer Fraktionen aus Gesamtgehirn wurde bei erwachsenen Ratten das Ausmaß von Stoffwechselvorgängen in einigen Gehirnfractionen (Kerne, Gewebetrümmer, Nervenendigungen, Mitochondrien, Mikrosomen) und speziell im Myelin untersucht.

Dazu wurden von den Gehirnfractionen der Tiere, denen zuvor intraperitoneal ^{35}S -Sulfat verabreicht worden war, die Lipotide bzw. Sulfatide gewonnen, und deren spezifische Radioaktivität gemessen.

Es zeigte sich ein geringer Einbau des ^{35}S -Sulfats in alle untersuchten Fraktionen. Im Myelin ließ sich der geringe Einbau auch noch bei verfeinerter Versuchsanordnung mit Sicherheit nachweisen.

Orientierende Vorversuche über die Zeitabhängigkeit der Myelinsulfatidmarkierung ergaben, daß das Maximum des ^{35}S -Sulfat-Einbaus in die Sulfatide der Markscheide später als 24 Stunden nach der Precursorapplikation erreicht wird. Ein Abbau dieser Lipotide findet statt; die radioaktive Markierung beträgt nach 37 Tagen nur noch die Hälfte.

Es wird diskutiert, ob diese Stoffwechselvorgänge im Myelin als Folge einer Neusynthese von Markscheidensubstanz oder als Austausch von alten gegen neue Bausteine bei erhaltener Myelinmenge anzusehen sind, und wo diese Prozesse sich lokalisieren lassen.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1) Aldridge, W.N., R.C. Emery und B.W. Street:
Biochem.J. 77, 326 (1960)
- 2) August, C., A.N. Davison und F. Maurice-Williams:
Biochem.J. 81, 8 (1961)
- 3) Autilio, L.A., W.T. Norton und R.D. Terry:
J.Neurochem. 11, 17 (1964)
- 4) Bakke, J.E. und W.E. Cornatzer:
J.biol.Chemistry 236, 653 (1961)
- 5) Bunge, M.B., R.P. Bunge und G.D. Pappas:
J.Cell Biol. 12, 448 (1962)
- 6) Cuzner, M.L., A.N. Davison und N.A. Gregson:
J.Neurochem. 12, 469 (1965)
- 7) Cuzner, M.L., Davison A.N. und N.A. Gregson:
Ann.N.Y.Acad.Sci. 122-1, 86 (1965)
- 8) Davison, A.N., und J. Dobbing:
Biochem.J. 73, 701 (1959)
- 9) Davison, A.N. und N.A. Gregson:
BiochemJ. 85, 558 (1962)
- 10) Davison, A.N.:
Metab.Physiol.Signif.Lipids, Proc.Cambridge, Engl. 1964, 527
- 11) Davison, A.N., und N.A. Gregson:
Biochem.J. 98, 915 (1966)
- 12) Debuch, H.:
Metab.Physiol.Signif.Lipids, Proc.Cambridge, Engl. 1964, 537
- 13) Eichberg, J. und R.M.C. Dawson:
Biochem.J. 96, 644 (1965)
- 14) Evans, M.J., und J.B. Finean:
J.Neurochem. 12, 729 (1965)
- 15) Finean, J.B.:
Circulation 26, 1151 (1962)
- 16) Finean, J.B. und R.E. Burge:
J.molecular Biol. 7, 672 (1963)
- 17) Gent, W.L.G., Gregson N.A., D.B. Gammack und J.H. Raper:
Nature 204, 553 (1964)
- 18) Geren, B.B.:
Exp.Cell Res. 7, 558 (1954)
- 19) Green, J.P. und J.D. Robinson jr.:
J.biol.Chemistry 235, 1621 (1960)

- 20) Heald, P.J. und M.A. Robinson:
Biochem.J. 81, 157 (1961)
- 21) Hulcher, F.H.:
Arch.Biochem.Biophysics 100, 237 (1963)
- 22) Jatzkewitz, H.:
Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 311, 279 (1958); ibidem
318, 265 (1960); ibidem 320, 134 (1960)
- 23) Jatzkewitz, H.:
Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 336, 25 (1964)
- 24) Koch, W. und M.L. Koch:
J.biol.Chemistry 15, 423 (1913); ibidem 31, 395 (1917)
- 25) Laatsch, R.H., S.Gordon, M.W. Kies und E.C. Alvord jr.:
Federation Proc. 20, 343 (1961)
- 26) Lees, M., Folch J., G.H.S. Stanley und S.J. Carr:
J.Neurochem. 4, 9 (1959)
- 27) Mehl, E. und H. Jatzkewitz:
Naturwissenschaften 6, 227 (1963)
- 28) Metuzals, J.:
Progr.Brain Res. 6, 76 (1964)
- 29) Norton, W.T. und L.A. Autilio:
Ann.N.Y.Acad.Sci. 122-1, 77 (1965)
- 30) O'Brien, J.S.:
Science 147, 1099 (1965)
- 31) Patterson, J.D.E. und J.B. Finean:
J.Neurochem. 7, 251 (1961)
- 32) Peters, A.:
J.biophysic.biochem.Cytol. 7, 121 (1960); ibidem 8, 431
(1960)
- 33) Radin, N.S., F.B. Martin und J.R. Brown:
J.biol.Chemistry 224, 499 (1957)
- 34) Robertson, J.D.:
J.biophysic.biochem.Cytol. 4, 349 (1959)
- 35) Robertson, J.D.:
Progr.Biophysics biophysic.Chem. 10, 356 (1960)
- 36) Salo, T. und D.M. Kouns:
Analytic.Biochem. 13, 74 (1965)
- 37) Sandhoff, K.:
Diplomarbeit, Univ.München 1963
- 38) Vandenheuvel, F.A.:
J.Amer.Oil Chemist's Soc. 42-6, 481 (1965)

- 39) Waelsch, H., W.M. Sperry und V.A. Stoyanoff:
J.biol.Chemistry 140, 885 (1941)
- 40) Whittaker, V.P.:
Biochem.J. 72, 694 (1959)
- 41) Whittaker, V.P., J.Eichberg jr. und R.M.C. Dawson:
Biochem.J. 92, 91 (1964)
- 42) Wolman, M.:
Bull.Res.Counc.Israel 6 E, 27 (1957)

Herrn Prof. Dr. H. Jatzkewitz möchte
ich für die Überlassung des Themas und
die Mühen, die ihm durch diese Arbeit
entstanden, herzlich danken.

L E B E N S L A U F

Am 5.10.1939 wurde ich in Freiburg/Br. geboren als erster der beiden Söhne des Dachdeckermeisters Josef Meschede und seiner Ehefrau Christel, geb. Müller. In Bad Wurzach/Allgäu besuchte ich die Volksschule und anschließend das Humanistische Gymnasium "Salvatorkolleg", wo ich am 26.3.1958 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1958 begann ich in Tübingen das Doppelstudium der Chemie und der Medizin. Die Vorprüfung zur Diplomprüfung legte ich am 6.11.1962 und die ärztliche Vorprüfung am 2.4.1963 ab. An der Freien Universität Berlin war ich vom Winter 1962/63 an drei Semester immatrikuliert und in Montpellier/Frankreich im Sommer 1964. Nach München kam ich im Wintersemester 1964/65 und bestand hier die ärztliche Prüfung am 9.2.1967.

Im März 1965 erhielt ich von Herrn Prof. Dr. H. Jatzke-witz das Thema zu meiner Dissertation, deren experimenteller Teil im März 1966 abgeschlossen wurde.

